

Avaliação de microdanos no osso: Uso de uma ferramenta complementar para visualização tridimensional

• **Isabella de A. Francisquini** Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil • **Ricardo A. Caldas** Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil • **Gustavo D. Rabelo** Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

RESUMO | *Objetivo:* Demonstrar o uso da visualização tridimensional (3D) na avaliação dos microdanos no osso com imagens histológicas. *Métodos:* Foram utilizadas imagens histológicas obtidas de amostras de osso não demineralizadas, incluídas em metilmetacrilato e coradas em Calceína e com Alaranjado de Xylenol. Imagens que continham microdanos (microtrincas, danos difusos e microfraturas), analisadas por microscopia de luz polarizada ou contraste de fase, foram processadas para criar uma imagem 3D. A imagem tridimensional foi gerada utilizando-se o plugin *Interactive 3D Surface Plot* para o software *ImageJ*. *Resultados:* A morfologia dos microdanos foi mais bem observada nas imagens 3D obtidas neste estudo, visualizada tanto em suas cores originais ou no esquema multicolor (Spectrum LUT). O esquema multicolor *Spectrum LUT* permitiu diferenciar melhor os microdanos em relação à profundidade, uma vez que a diferenciação por cores é baseada nas características da superfície analisada. Maiores valores de um ponto no eixo z é representando na imagem por cores mais quentes. *Conclusões:* O uso da visualização tridimensional de forma complementar à análise convencional dos microdanos aprimorou sobremaneira sua avaliação morfológica e permitiu avaliar estes microdanos em diferentes perspectivas manipulando a imagem em diferentes eixos e posições.

DESCRITORES | Osso; Microdanos; Microtrinca; Fratura; Imagem Tridimensional; Imagem 3D.

ABSTRACT | **Bone microdamage evaluation: a supplementary tool to provide three-dimensional visualization** • *Objectives:* This technical report demonstrates the use of a 3D visualization tool to evaluate bone microdamage in histological sections. *Methods:* Histological sections obtained from non-demineralized bone fragments stained with Calcein and Xylenol Orange and embedded in methyl methacrylate were used. Sections containing microdamages (microcracks, diffuse damage and/or microfractures) were assessed to create a 3D image with the use of polarization and phase-contrast microscopies by light optical and confocal microscopes, respectively. The 3D images were created with the use of a plugin named “Interactive 3D Surface Plot” for ImageJ. *Results:* Microdamage morphology was better evaluated by means of the 3D image obtained, visualized in both plots of original colors and Spectrum LUT multicolor. The different colors in the Spectrum LUT highlighted the damage and improved visualization. *Conclusions:* The use of 3D visualization to supplement classic bone microdamage evaluation improves the assessment of damage morphology and enhances their analysis by changing the perspective in different views.

DESCRIPTORS | Bone; Microdamage; Microcrack; Fracture; Three-Dimensional Imaging; Computer-Generated 3D Imaging.

AUTOR CORRESPONDENTE | • **Prof. Gustavo Davi Rabelo** Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina • Rua Delfino Conti, 1240, Bairro Trindade, Florianópolis, SC, Brasil • 88040-900 E-mail: gustavo.rabelo@ufsc.br

• Received May 26, 2020 • Accepted September 15, 2020

• DOI <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2357-8041.cldr.2020.170117>

INTRODUÇÃO

Microdanos são danos estruturais que ocorrem no osso em nível microscópico, podendo ser encontrados tanto no osso cortical quanto no osso trabecular.¹ Ocorrem de forma contínua e frequente, e servem como alvo para o reparo, promovido pela ação de unidades multicelulares compostas por osteoblastos e osteoclastos.²

O processo de reparo se dá pela remodelação óssea, orquestrada pela ação dos osteócitos, que tem suas interconexões interrompidas no trajeto do microdano.³ De acordo com a descrição de Chapurlat e Delmas² e Green et al.,⁴ os microdanos podem ser classificados como linear (*microcrack*), dano difuso ou microfratura, sendo: linear – fissuras com bordas afiadas e de tamanho intermediário (maior que os canalículos dos osteócitos e menor que os canais vasculares); danos difusos – danos lineares formando intersecções em cruz, atingindo extensões maiores que os danos lineares isoladamente; microfraturas – semelhante aos danos lineares, mas, nestes casos, apresentam grandes extensões com separação total ou parcial das estruturas.

O equilíbrio entre a formação e o reparo dos microdanos é essencial para a manutenção da saúde do tecido ósseo. Esses mecanismos são responsáveis pela renovação, remodelação, regulação fisiológica óssea e preservação sua resistência mecânica.^{1,5} No entanto, quando esse equilíbrio se encontra alterado, seja pelo aumento da formação de microdanos ou como pela redução da capacidade de reparo,^{1,6} resulta em redução da resistência mecânica do tecido ósseo e consequente aumento do risco de fraturas maiores (por exemplo, fratura espontânea de fêmur).^{2,5} Além disso, microdanos são importantes determinantes da qualidade óssea^{2,5,7} utilizados para avaliar a fragilidade esquelética com implicações clínicas significativas.²

Para analisar a presença e a morfologia dos microdanos ósseos, é necessário o uso de técnicas de microscopia ou microtomografia. As amostras podem ser examinadas em microscopia de fluorescência,

de luz polarizada^{7,8} ou confocal de varredura a laser, com a análise e quantificação dos microdanos em sua morfologia e profundidade.^{1,2,7} As imagens obtidas devem ser avaliadas qualitativamente, para classificar o tipo de microdano, e quantitativamente, para obter seus dados da densidade e extensão. Desse modo, as análises podem ocorrer de forma bidimensional ou tridimensional, de acordo com protocolos específicos.^{7,8}

Assim, o objetivo desta nota técnica é abordar o processamento de imagens histológicas na avaliação dos microdanos em osso, com complementação da análise por meio da obtenção da visualização tridimensional, que visa aprimorar a identificação e a análise morfológica desses microdanos.

NOTA TÉCNICA

Foram selecionadas imagens histológicas de microdanos identificados no tecido ósseo em diversas situações. As imagens fazem parte do acervo pessoal do autor correspondente deste artigo (GDR), provenientes de estudos previamente realizados nas seguintes instituições: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia, Minas Gerais, Brasil), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil) e no Institut National de la Santé et la Recherche Médicale: UMR 1033 Physiopathologie, Diagnostic et Traitements des Maladies Osseuses (Lyon, Rhône-Alpes, França). Cinquenta imagens foram selecionadas contendo os três tipos básicos de microdanos, distribuídas da seguinte forma: a) 30 imagens provenientes de estudos em animais selecionadas de amostras obtidas da tíbia de coelhos e de costelas bovinas; e b) 20 imagens provenientes de estudos em humanos selecionadas de amostras obtidas de fêmures e mandíbulas. Atentou-se para a escolha em diferentes espécies pelas peculiaridades dos microdanos em cada caso, pois sabe-se que variam em tamanho e extensão. Na ocasião da realização dos estudos,

todos foram aprovados nos seus respectivos Comitês de Ética em Pesquisa.

A técnica para análise dos microdanos pode ser dividida em cinco etapas: obtenção das amostras, coloração, inclusão em resina, preparo das lâminas e análise microscópica, que devem ser realizadas rigorosamente na sequência descrita. Ainda, como análise complementar, pode-se lançar mão de ferramentas de processamento de imagem para visualização tridimensional nos danos. A seguir, serão descritas as etapas.

Obtenção das amostras

As amostras de tecido ósseo podem ser obtidas de diversas formas, de acordo com a região de interesse a ser estudada. Desse modo, diferentes formas de obtenção são observadas na literatura, utilizando trefinas ou outros materiais para secção dos fragmentos.^{7,8} Imediatamente após a obtenção, deve-se fixar a amostra em álcool 70%.¹ A escolha do álcool 70%, e não do álcool absoluto, é principalmente pelo longo tempo de fixação e armazenamento das amostras, podendo criar trincas artificiais se a amostra desidratar. Ainda, a formalina também não é escolhida porque atrapalha na análise por fluorescência em relação aos corantes que vão ser utilizados.

Coloração

A peça deve ser corada previamente à inclusão em resina para permitir a distinção entre os microdanos

e artefatos provenientes do preparo das lâminas. Assim, na análise histológica, todos os microdanos serão observados corados e os artefatos de técnica aparecerão sem coloração. Os corantes comumente utilizados são: calcéina (Co875, Sigma, Saint-Louis, MO, USA), fucsina básica e alaranjado de xilenol (Xylenol Orange tetrasodium salt, Sigma-Aldrich) para microscopia de fluorescência.^{1,7}

Inclusão em resina

Em seguida, as amostras coradas são incluídas em metilmetacrilato pela técnica convencional para inclusão de osso sem desmineralização (Figura 1A), utilizando solventes (dibutilftalato) e ativadores (peróxido de benzoíla).⁷

Preparo das lâminas

As lâminas histológicas são obtidas partir dos blocos em resina com auxílio de cortadeira de precisão (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) com disco diamantado (velocidade 250 RPM, disco 15, cm × 0,5 mm, Figura 1B) ou cortadeira de precisão vertical por fio diamantado (Figura 1C), devendo a lâmina ter espessura final entre 80 e 120 µm. Depois dos cortes, as fatias obtidas passam por processo de polimento (por exemplo, pasta de hidróxido de alumínio) e limpeza (por exemplo, imersão em cuba de ultrassom), para então serem montadas em lâminas de microscopia.^{7,8}



FIGURA 1 | Metodologia para análise dos microdanos. A) Inclusão do fragmento ósseo em metilmetacrilato. Corte do bloco para obtenção das lâminas histológicas: B) em cortadeira de precisão com disco diamantado ou C) em cortadeira vertical com fio diamantado.

Análise microscópica

As técnicas convencionais de microscopia para avaliar os microdanos exigem experiência e treinamento prévio do operador. Na microscopia de luz, são duas etapas: primeiro a análise por microscopia de fluorescência, seguida pela análise em microscopia ótica de luz polarizada. Já na microscopia confocal, são utilizados a fluorescência e o contraste de fase, posteriormente visualizados simultaneamente. As imagens histológicas obtidas são bidimensionais, servindo para classificar os microdanos e calcular sua densidade (pelo número de microdanos dividido pela área óssea analisada). Os danos lineares são observados com bordas afiadas e circundadas por um halo brilhante com a coloração atingindo planos mais profundos na microscopia de fluorescência (Figuras 2A, 2C e 3A). Ainda, os danos são passíveis de visualização em profundidade ao variar o ajuste fino de foco durante análise por luz polarizada (Figuras 2B e 2D) ou por contraste de fase (Figura 3B). Para danos difusos, observa-se o formato do dano em cruz com coloração brilhante durante a microscopia de fluorescência (Figura 2E) e em análise por luz polarizada visualiza-se a área com menos birrefringência correspondente ao dano (Figura 2F). Para as microfraturas, visualizam-se semelhanças com os danos lineares. No entanto, devido à separação total ou parcial da estrutura óssea, observam-se amplas áreas de coloração por fluorescência (Figuras 2G e 3C), assim como amplas áreas enegrecidas na microscopia por luz polarizada (Figura 2H) ou por contraste de fase (Figura 3D). Artefato de técnica pode ser observado na Figura 2I, com presença de dano associado à ausência de halo brilhante.

Neste estudo, foram utilizados dois sistemas para análise microscópica: a microscopia de fluorescência e em luz polarizada foram conduzidas no Axiophot HB 50 ZEISS Microscope (Oberkochen, Germany) acoplado à câmera AxioCam ICc3 câmera ZEISS (Oberkochen, Germany). A microscopia confocal foi conduzida no Confocal LSM 510 Meta ZEISS (Oberkochen, Germany), utilizando laser de argônio no comprimento de 458 nm, com espectro

de emissão entre 521-628 nm. Os microdanos foram medidos utilizando aumento de duzentas vezes.

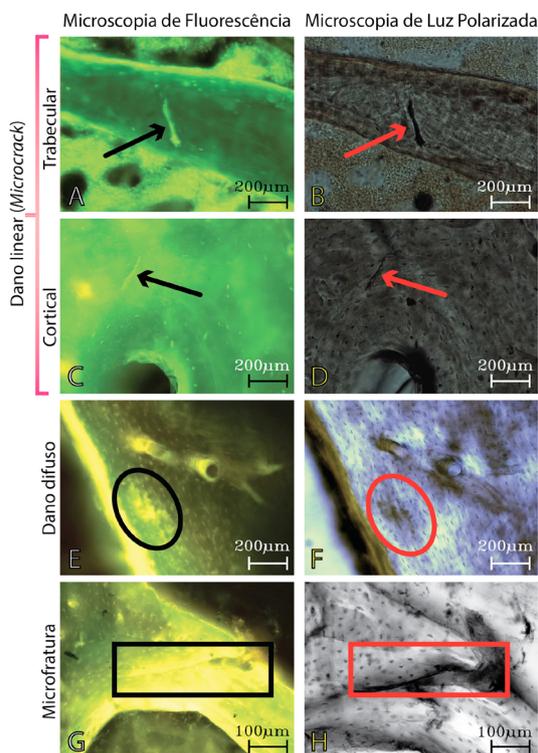


FIGURA 2 | Microdanos em tecido ósseo visualizados em microscopia de fluorescência (A, C, E e G) e em microscopia de luz polarizada (B, D, F e H). Danos lineares (setas), dano difuso (círculos) e microfraturas (retângulos).

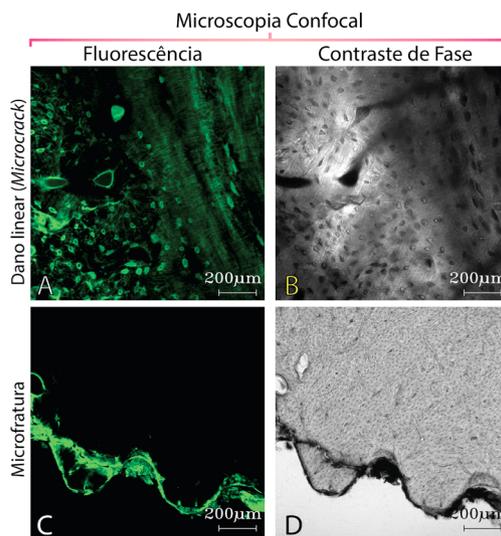


FIGURA 3 | Microdanos em tecido ósseo visualizados em microscopia confocal (A e C em fluorescência, B e D em contraste de fase). Dano linear (A e B) e microfratura (C e D).

Ferramentas auxiliares para processamento de imagem

A partir das imagens dos microdanos por microscopia de luz polarizada e por contraste de fase, podem-se simular reconstruções tridimensionais (3D) como análise complementar na avaliação da morfologia, extensão e profundidade dos danos. As imagens são processadas pelo software gratuito ImageJ (ImageJ 1.48j, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) associado à ferramenta adicional Interactive 3D Surface Plot (v2.33). Para gerar as imagens tridimensionais, a ferramenta foi configurada da seguinte forma: Grid size em 256, Smoothing em 1.0, com escala máxima em 100% e mínima em zero. Nesta ferramenta, as informações do histograma podem ser processadas na forma Original Colors ou Spectrum LUT.

Ao reconstruir a imagem em 3D proveniente do Original Colors, pode-se trabalhar evidenciando a profundidade do microdano pelo ajuste de perspectiva, observando os microdanos correspondentes aos tons mais escuros do histograma (Figura 4). A ferramenta *Spectrum LUT* (sigla LUT do inglês *look-up table*) ajusta de forma automática matiz, saturação e brilho, gerando uma nova imagem multicolor. Por meio do *Spectrum LUT*, a visualização dos microdanos fica em evidência pelas cores mais quentes (tons avermelhados), aprimorando sobremaneira o entendimento da morfologia, profundidade e extensão

dos danos (Figura 5). Ainda, nota-se que as lacunas dos osteócitos se diferem por cores dos microdanos, permitindo identificar que as lacunas dos osteócitos têm uma profundidade reduzida quando comparadas aos microdanos (Figura 5).

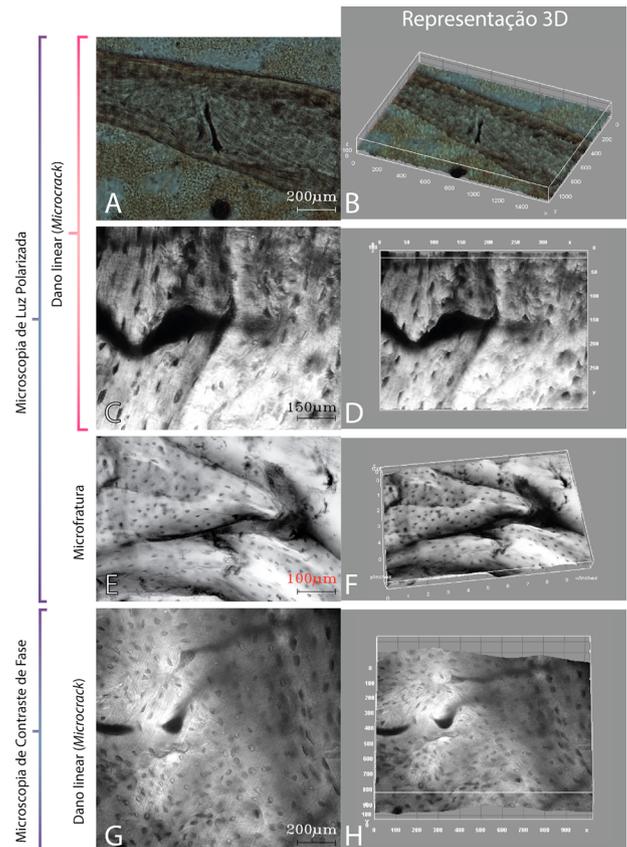


FIGURA 4 | Microdanos em 2D e 3D. Microdanos visualizados em microscopia de luz polarizada e contraste de fase em 2D (A, C, E e G) e visualizados em 3D no esquema de cores originais (B, D, F e H).

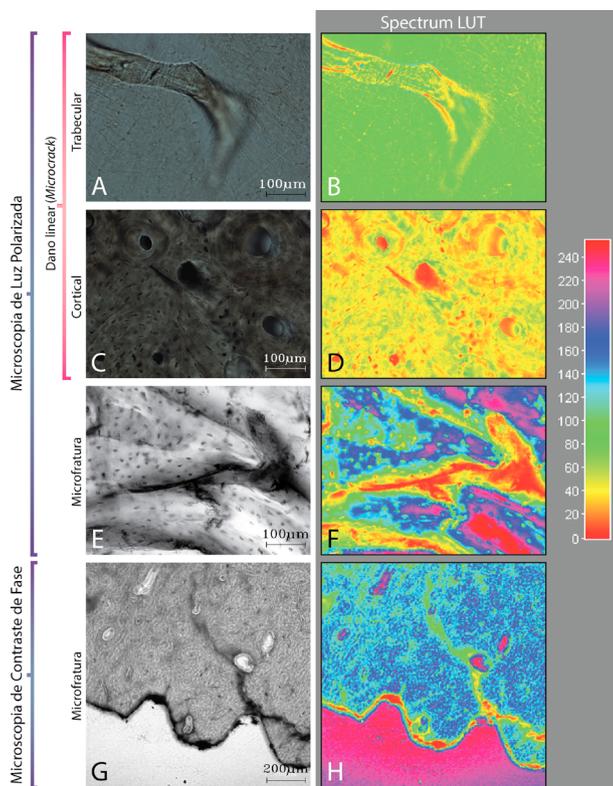


FIGURA 5 | Microdanos em 2D e 3D. Microdanos visualizados em microscopia de luz polarizada e contraste de fase em 2D (A, C, E e G) e visualizados em 3D no esquema multicolor *Spectrum LUT* (B, D, F e H). Ao lado a escala multicores variando de 0-255.

DISCUSSÃO

A qualidade do osso é relacionada a diversas propriedades do tecido ósseo, dentre elas: qualidade mineral, qualidade do colágeno, presença de microdanos e capacidade de adaptação contínua de acordo com as mudanças no seu microambiente. Macroscopicamente, o osso é um material anisotrópico e viscoelástico. Ainda, sabe-se que alterações em sua microarquitetura inferem diretamente em suas propriedades mecânicas.⁹ Nas situações em que cargas excedem a capacidade do osso de suportar a força recebida, sejam estas patológicas ou fisiológicas, resultarão em deformações permanentes no tecido com a geração de microdanos para que haja dissipação de energia.^{2,5} Após o aparecimento dessas micro lesões, a região torna-se alvo de remodelação direcionada (não

estocástica),² desencadeada no osso por uma cascata de eventos modulada pelos osteócitos que perderem sua comunicação célula-célula.³

Os microdanos podem ser avaliados no tecido ósseo por meio da avaliação histológica. Nesta metodologia, o osso é corado e incluído em um material resinoso (MMA) sem passar por descalcificação. Nas imagens histológicas obtidas por microscopia de luz e microscopia confocal, é possível avaliar morfologia e tamanho dos microdanos. No entanto, devido às limitações das técnicas, torna-se necessário lançar mão de métodos auxiliares que possibilitam aprimorar a análise dos microdanos no osso.

A criação de imagens em 3D, por meio de imagens histológicas originais em 2D, complementou de forma significativa a visualização dos microdanos como demonstrado nesta nota técnica. Em microscopia confocal, a partir da reconstrução 3D, é possível mensurar toda a extensão transversal dos danos. O princípio da confocalidade oferece vantagens em termos de análise, permitindo a criação de *stacks* compreendendo todo eixo vertical do microdano ou trinca. O'Brien et al.¹⁰ avaliaram microcracks lineares utilizando avaliação por epifluorescência (luz UV) seguida por reconstrução tridimensional por métodos computacionais e comparou com as reconstruções obtidas por microscopia confocal. Como conclusão, os autores relataram que o tamanho e a forma elíptica dos microdanos lineares foram similares em ambas as técnicas. No entanto a microscopia confocal não é comumente acessível em todos os centros de pesquisa e universidades, com o agravante para técnicas que exigem longos períodos de operação (as lâminas devem ser avaliadas em sua totalidade para o cálculo dos microdanos). Desse modo, utilizar visualizações tridimensionais empregando ferramentas computacionais de processamento de imagens disponíveis gratuitamente torna-se uma forma viável e plausível para a avaliação dessas lesões microscópicas no osso.

A reconstrução de uma imagem 3D passível de manipulação, variando a posição de visualização e perspectiva, confirma de modo mais seguro a extensão do dano em profundidade. Também, o uso de esquemas multicores (*Spectrum LUT*) formados a partir das informações dos canais de cores originais auxiliou na percepção da presença dos microdanos, com nítida diferença entre a profundidade dos mesmos que pode ser comparada à profundidade das lacunas dos osteócitos, por exemplo. A mudança de perspectiva na visualização das imagens 3D, inclusive com possibilidade de rotação e observação nos diferentes eixos, aperfeiçoa a análise destas fissuras, trincas e fraturas ósseas.

CONCLUSÕES

A obtenção de uma imagem tridimensional do microdano em tecido ósseo complementou de forma substancial sua análise morfológica. A avaliação dos danos lineares, difusos e das microfraturas, por meio da técnica convencional, foi complementada com a visão tridimensional, tanto em um esquema multicolor quanto nas cores originais, o que possibilitou uma análise qualitativa aprimorada por meio da variação de perspectiva da imagem 3D.

AGRADECIMENTOS

Resultados parciais deste estudo foram publicados na Dissertação de Mestrado da primeira autora (IAF), incluindo a publicação da imagem 2G e 2H (Banco de Teses e Dissertações, Universidade Federal de Juiz de Fora). O autor GDR agradece as instituições onde os estudos foram realizados e o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Dominguez VM, Agnew AM. Microdamage as a bone quality component: practical guidelines for the two-dimensional analysis of linear microcracks in human cortical bone. *JBMR Plus*. 2019 Jul 17;3(6):e10203. doi: 10.1002/jbm4.10203
2. Chapurlat RD, Delmas PD. Bone microdamage: a clinical perspective. *Osteoporos Int*. 2009 Aug;20(8):1299-308. doi: 10.1007/s00198-009-0899-9
3. Dooley C, Tisbo P, Lee TC, Taylor D. Rupture of osteocyte processes across microcracks: the effect of crack length and stress. *Biomech Model Mechanobiol*. 2012 Jul;11(6):759-66. doi: 10.1007/s10237-011-0349-4
4. Green JO, Nagaraja S, Diab T, Vidakovic B, Guldberg RE. Age-related changes in human trabecular bone: relationship between microstructural stress and strain and damage morphology. *J Biomech*. 2011 Aug 11;44(12):2279-85. doi: 10.1016/j.jbiomech.2011.05.034
5. Vashishth D, Tanner KE, Bonfield W. Contribution, development and morphology of microcracking in cortical bone during crack propagation. *J Biomech*. 2000 Sep;33(9):1169-74. doi: 10.1016/s0021-9290(00)00010-5
6. Lee TC, Staines A, Taylor D. Bone adaptation to load: Microdamage as a stimulus for bone remodelling. *J Anat*. 2002 Dec;201(6):437-46. doi: 10.1046/j.1469-7580.2002.00123.x
7. Rabelo GD, Portero-Muzy N, Gineyts E, Roux JP, Chapurlat R, Chavassieux P. Spatial distribution of microcracks in osteoarthritic femoral neck: influence of osteophytes on microcrack formation. *Calcif Tissue Int*. 2018 Dec;103(6):617-24. doi: 10.1007/s00223-018-0456-7
8. Portero-Muzy NR, Chavassieux PM, Arlot ME, Chapurlat RD. Staining procedure for the detection of microcracks: application to ewe bone. *Bone*. 2011 Oct;49(4):917-9. doi: 10.1016/j.bone.2011.07.001
9. Farlay D, Boivin G. Bone mineral quality [Internet]. *IntechOpen*. 2012 [cited 2019 May 19]. doi: 10.13140/2.1.1530.4644
10. O'Brien FJ, Taylor D, Lee TC. Microcrack accumulation at different intervals during fatigue testing of compact bone. *J Biomech*. 2003 Jul;36(7):973-80. doi: 10.1016/s0021-9290(03)00066-6